ENZYMOLOGIE

I. PROPRIETES GENERALES

A. DEFINITION

Une enzyme est un catalyseur biologique.
Les réactions chimiques sont régies par la loi d'action de masse :

une réaction :

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

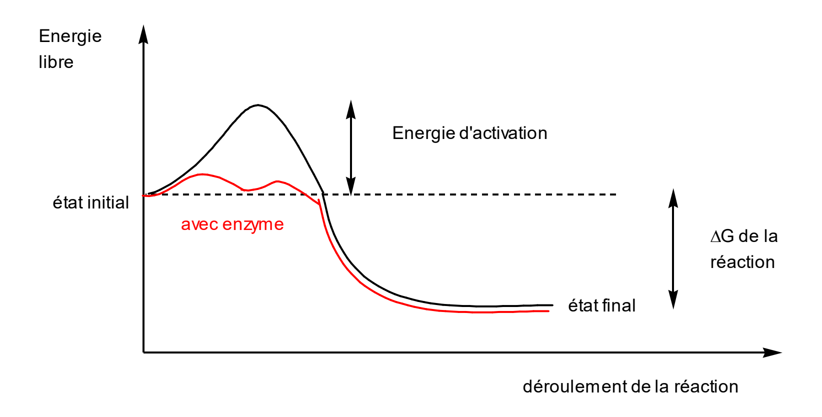
a une constante d'équilibre K_{eq}

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Exemple :

$$2\ CO_2 \rightleftharpoons 2\ CO + O_2$$

La réaction est lente. Un catalyseur est nécessaire.
Un catalyseur est une substance qui accélère la réaction mais qui n'apparaît pas dans le bilan.
Les catalyseurs agissent en diminuant l'énergie d'activation et en augmentant la vitesse de réaction.
(la réaction doit être thermodynamiquement possible : $\Delta G < 0$).



Si l'énergie d'activation est grande, la réaction est lente.
La présence du catalyseur nécessite une énergie d'activation moins importante.
En biologie, les catalyseurs sont à 99 % des protéines[1] : des enzymes.
Les enzymes ont une *double spécificité*

- vis à vis du substrat
- vis à vis de la réaction.

B. NOMENCLATURE

Les enzymes sont nommées en ajoutant le suffixe ase au nom du substrat sur lequel elles agissent :

- lipase : hydrolye les graisses
- amylase : hydrolyse l'amidon

Les enzymes qui catalysent des réactions peuvent recevoir le nom de l'action réalisée.
Exemples :

- déshydrogénase
- décarboxylase...

Actuellement, la nomenclature internationale comporte deux parties

- nom du ou des substrats
- type de réaction catalysée + terminaison en « ase »

---

[1] 1 % : rares molécules de RNA

D Hexose + ATP ⟶ ADP + D Hexose 6 phosphate

hexokinase

= ATP D hexose phospho transférase (nomenclature int)

On l'appelle plus couramment « hexokinase » : une kinase est une enzyme qui fixe un acide phosphorique sur une molécule quelle qu'elle soit.

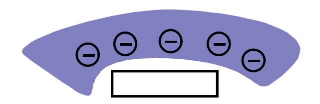
C. *MECANISME D'ACTION*

Notion de site actif

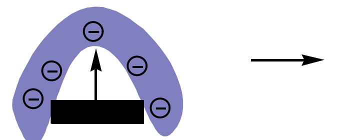
Les enzymes sont des protéines : enchaînement d'acides aminés. Ce sont des molécules de grande taille. Sur ces molécules, une région restreinte est réservée au processus de catalyse.

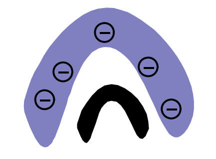
.

Enzyme fictif : la « batonase » qui casse le fer
On a pensé d'abord que le substrat se moulait dans une cavité de l'enzyme
l'aimant qui fixe la barre de fer ne peut pas casser la barre



En fait : dans la poche, l'attraction tord la barre de fer et la casse : c'est le modèle du site catalytique d'une enzyme.
Ce système s'appelle *l'ajustement induit du substrat au site actif.*





⇒ double spécificité

- / substrat
- / réaction

Pour l'enzyme réel : interaction substrat - enzyme

- liaisons H
- van der Waals
- type ionique

Exemple d'une enzyme réelle :action de la carboxypeptidase A : elle détache à partir du COOH terminal le dernier a.a. d'une chaîne polypeptidique.
(ne pas retenir mais comprendre :

R—C—H, N—H, O=C, CH_2, Prot, Zn^{2+}, HO, GLU 270, TYR_{248}

H_2O

La charge ⁻ de l'enzyme agit sur le C de la protéine. OH de l'enzyme cède son H à l'a.a..
La liaison peptidique est coupée, l'a.a. est libéré.
L'enzyme retourne à son état initial. Elle n'intervient pas dans le bilan de la réaction.

⇒ Deux a.a. interviennent dans le *site actif* : glu 270 et tyr 248. Ce sont deux a.a. éloignés dans la chaîne peptidique mais proche dans l'espace : importance de la structure spatiale. Un H de OH de Tyr 248se fixe sur le NH du dernier aa. Le COO^- de Glu 270 se fixe provisoirement sur le carboxyle de l'aa suivant, pendant quelques millièmes de secondes. Une molécule d'eau intervient ensuite, permettant la régénération de la tyrosine. L'aa est alors totalement détaché. La molécule d'eau a hydrolysé la liaison entre Glu 270 et la protéine. A la fin de la réaction, l'enzyme se tretrouve dans le même état qu'au départ.
D'autres a.a. interviennent

- pour la fixation du substrat sur l'enzyme : ce sont des interactions de type faible : ioniques au maximum, souvent hydrogènes ou Van der Walls
- pour maintenir la structure spatiale (qui fait que Glu 270 soit proche de Tyr 248)

Une mutation qui remplacerait Tyr par Val ferait que l'enzyme ne fonctionne pas.
Une mutation plus éloignée pourrait perturber la fixation de la protéine au substrat et modifierait ou ralentirait la réaction. C'est ce qui se passe dans certaines maladies génétiques. Par exemple : un pont disulfure maintenant 2 aa proches l'un de l'autres alors qu'ils sont éloignés sur la chaîne.

D. Notion de coenzyme

1. Définition

Certaines enzymes ne peuvent avoir d'activité catalytique qu'en présence d'une *molécule organique spécifique*, et de *faible poids moléculaire* : coenzyme. (souvent il faut au niveau du site actif un ion métallique comme Zn^{2+} dans les carboxypeptidases : c'est une molécule aidant un catalyseur, ce n'est pas un coenzyme).

Si une coenzyme est nécessaire, le système s'appelle une holoenzyme. Elle est formée de :

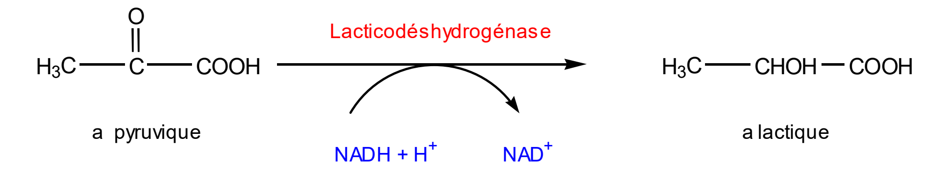
- chaîne peptidique : apoenzyme
- coenzyme liée à l'enzyme

  par des liaisons faibles : hydrogène, Van der Waals le plus souvent

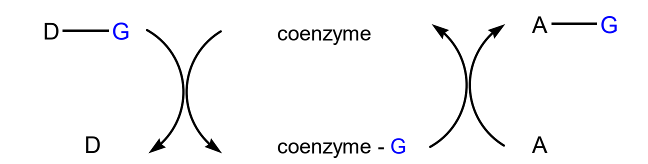
  rarement par des liaison covalentes : le coenzyme est fixé dans le site actif de l'enzyme.

2. Rôle des coenzyme comme réactif de transfert de groupe : cosubstrats

Certaines coenzymes se présentent comme des *cosubstrats*
Exemple du transfert de deux H sur l'acide pyruvique (produit final de la glycolyse) pour donner l'acide lactique :



NAD est considéré comme *cosubstrat.*
L'enzyme s'appelle lacticodéshydrogénase car elle fonctionne dans les 2 sens en fonction des concentrations des différents substrats.
(La lacticodéshydrogénase a une grande importance dans la glycolyse anaérobie.)
Certains coenzymes peuvent transférer des groupes fonctionnels sur d'autres molécules :



⇒ le coenzyme sert de transporteur entre D et A (cf a. pyruvique).

3. Etude de coenzymes

a) coenzymes à structure nucléotidique

i *ATP* : adénosine triphosphate : rôle de transporteur

- d'acide phosphorique
- d'énergie par couplage réactionnel pour que la réaction ait $\Delta G < 0$

ATP

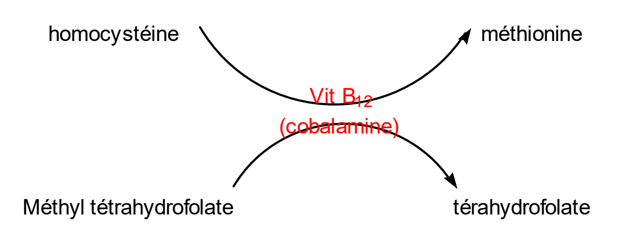
ii *coenzymes pyrimidiques* = amides nicotiniques : dérivés de vit PP. 2 principaux :
NAD : nicotinamide adénine di nucléotide
NADP = NAD phosphorylée
ce sont des transporteurs d'H

iii *coenzymes flaviniques* : dérivés de la vit B_2
FMN : flavine mono nucléotide
FAD : flavine adénine di nucléotide.
Ce sont des transporteurs d'hydrogène FAD $\wedge$ $FADH_2$.

iv *coenzyme A* : dérivé de l'acide panthoténique : vit B_5.
agit par l'intermédiaire d'une fonction thiol à l'extrémité du coenzyme : -SH : partie active qui permet de fixer notamment la fonction carboxylique des acides gras.
ex : acétyl coA
| activateur d'acides organiques, surtout les acides gras.

v dérivés de la vit B_{12}

La vit B_{12} est une molécule complexe : 5 désoxy adénosyl cobalamine.
Les dérivés interviennent dans des réactions importantes : les méthylations.
c'est le transfert d'un radical CH_3 d'une molécule sur une autre. Elle nécessite la présence de plusieurs coenzymes successifs et de donneurs de radicaux méthyl : la méthionine.



La vit B_{12} intervient dans

- des réactions qui transforment le N méthyl malonyl CoA $\wedge$ succinyl CoA dans le cycle de Krebs

- surtout dans le transfert de radicaux méthyl de la méthionine qui perd son CH_3 ∧ homocystéine. Le CH_3 est transféré sur un autre coenzyme intermédiaire : THF ∧ méthyl THF qui va être le coenzyme permettant la fixation de radicaux CH_3 sur la molécule d'uracile ∧ thymine.

URACILE THYMINE

On peut observer en pathologie des déficits

- en vitamine B_{12}
- en THF

Les anomalies apparaissent sur les cellules qui se divisent beaucoup : pour les GR, le déficit est à l'origine d'anémie mégaloblastique : grosse cellule souche dans la moelle osseuse car les divisions cellulaires se ralentissent du fait de l'impossibilité de fabriquer la thymine.
Les causes :

- carences alimentaires : pour la vit B_{12} dans certains pays et pour l'acide folique
- la vit B_{12} est ingérée dans les aliments. Elle doit se lier à une protéine de transport spécifique sécrétée par l'estomac, le facteur intrinsèque, pour pouvoir être absorbée au niveau de la dernière anse grêle. Le déficit en facteur intrinsèque est cause d'anémie. Il se voit dans certaines gastrites (anémies de Biermer).

b) Coenzymes non nucléotidiques

i Folates

Ils participent comme la vit B_{12} au transport des radicaux monocarbonés : pas seulement CH_3. Leur carence retentit également sur le transfert des radicaux méthyl.

ii dérivé de la vit B_6 : phosphate de pyridoxal = PPL.

Ce coenzyme joue un rôle dans les réaction de *désamination* (perte d'un groupement NH_2), ou de *transamination* (transfert d'un groupement NH_2 d'un molécule à une autre)

iii dérivé de la vit B_1 (thiamine) : thiamine pyrophosphate = TPP :

rôle dans les réaction de décarboxylation, parfois dans les réactions transcétolasiques : transport d'un groupement aldéhyde.

iv Biotine : réaction de carboxylation

C'est la fixation d'un CO_2 sur une molécule.
Ex : pyruvate carboxylase, acétylCoA carboxylase.

v acide lipoïque :

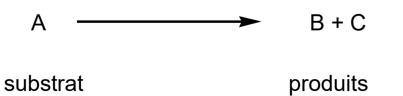
Il a une structure comme un acide gras, se terminant par un COOH. Il contient un pont disulfure S-S. Il joue un rôle de transporteur d'hydrogène. C'est un des coenzymes intervenant dans les réactions de décarboxylation oxydatives de l'acide pyruvique et de l'acide α cétoglutarique.

NB : Vitamine : composé qu'on ne peut pas synthétiser et qui doivent être fournies en petite quantité de façon continue pour un fonctionnement normal de l'organisme. Une vitamine n'est pas forcément un coenzyme et inversement.

II. CINETIQUE ENZYMATIQUE

une enzyme peut intervenir dans une réaction qui

- clive une protéine : catabolisme



- échange des groupes :

A + B ⟶ C + D

- intervient dans une réaction de synthèse :

A + B ⟶ C

A. QUANTIFICATION

Les enzymes sont des protéines qui existent en très petite quantité dans les cellules
⇒ la quantification de l'enzyme est très difficile

1. Vitesse de réaction

On peut mesurer l'activité catalytique des enzymes : pour mesurer la quantité d'enzyme, on peut mesurer la vitesse de réaction.
En effet, dans des conditions précises (température, pH), la vitesse est proportionnelle à la quantité d'enzyme. On exprime les résultats en unité enzymatique, c'est à dire en moles de substrat qui réagit ou en moles de produit qui apparaît par minute.
⇒ *définition de l'unité enzymatique* :
En général on utilise la micromole par minute : µmol /min. (10^{-6} mol /min) ou nanomol /min (10^{-9}). Parfois : 10^{-12} : picomol /min.
Les unités enzymatiques correspondantes sont : µU, nU et pU.
(le catal = mol/s. à 30° est l'unité internationale, très théorique)

2. Activité spécifique

Dans le cas où on connaît la quantité d'enzyme, la <u>meilleure mesure</u> s'exprime par l'activité spécifique moléculaire : c'est le nombre de moles de substrat transformé / min. / mole d'enzyme (par exemple un molécule d'enzyme pour 1000 molécules de substrat) dans les conditions de vitesse maximale (quantité de substrat suffisante pour que l'enzyme fonctionne à son maximum).

3. Mesure de l'activité : vitesse de réaction

a) Méthodologie

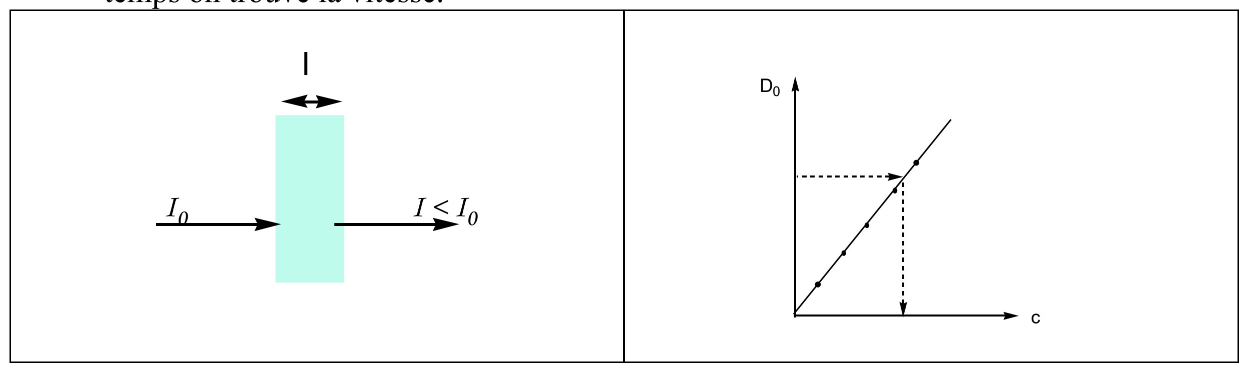
On prend une certaine quantité d'enzyme (dans un extrait cellulaire, du sang...). Après un certain temps (10 min) on arrête la réaction (par la chaleur) et on mesure soit la disparition du substrat soit l'apparition du produit.
En général, on essaie de coupler le produit à une réaction colorimétrique : spectrophotométrie. La coloration est alors proportionnelle à la quantité de produit. En divisant par le temps, on connaît la vitesse.

Loi de Beer Lambert :

$$DO = \varepsilon \, c \, l$$

- DO : densité optique pour une longueur d'onde donnée
- ε = facteur de proportionnalité : coefficient d'extinction molaire
- c : concentration molaire
- l : longueur du trajet du rayon lumineux dans la cuve.

En étalonnant avec une solution du produit la densité optique en fonction de la concentration, on a obtenu un courbe c en fonction de la densité optique.
La mesure de la densité optique de l'échantillon permet de connaître la concentration.
En multipliant par le volume, on connaît la quantité de produit. En divisant par le temps on trouve la vitesse.



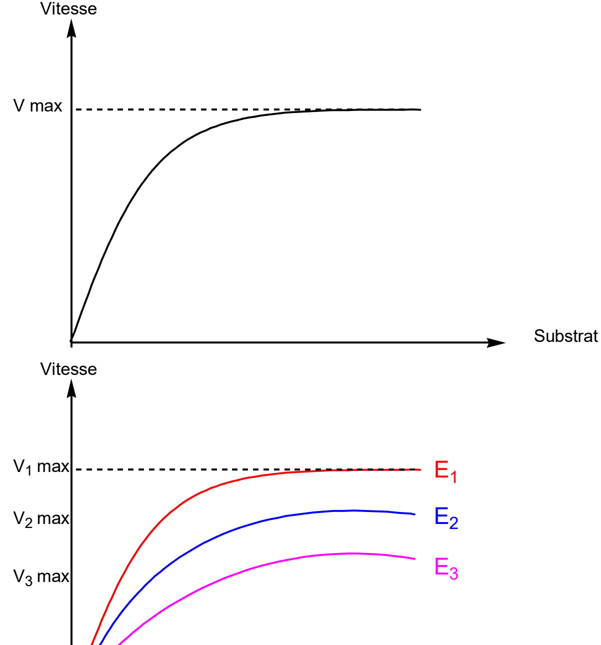
$I / I_0 = D$: mesuré par un spectrophotomètre.
D est proportionnel à c et à l.
I_0 est monochromatique
On peut utiliser des substrats radioactifs.

b) Facteurs influençant l'activité enzymatique

- *[enzyme]*
- *[substrat]* : peu de substrat ⇒ l'enzyme n'est pas à son maximum.
- présence ou non *d'inhibiteurs de la réaction*
- *température* : pour les homéothermes, le maximum d'activité est à 37°. Au delà de 40°, l'activité diminue par dénaturation, perte de la structure spatiale.
- *pH* : en général meilleur fonctionnement à 7,4, mais il existe des enzymes lysosomiaux dont le pH optimal est entre 4,5 et 5. Un pH trop acide peut dénaturer la protéine.

c) Evolution de la vitesse de la réaction en fonction de la quantité de substrat

([enzyme] = cte).
La vitesse maximale est atteinte quand tous les sites de l'enzyme sont occupés.
Pour une certaine quantité S le plateau est atteint : la vitesse n'augmente plus.



d) Evolution en fonction de la quantité d'enzyme

Si on fait varier la quantité d'enzyme, V_{max} va être différente.
Plus il y a d'enzyme, plus V_{max} ∨



4. Paramètres cinétiques d'une enzyme

C'est la vitesse et l'affinité d'une enzyme pour son substrat.

a) Equation de Michaelis et Menten

Michaelis et Menten ont calculé V_{max}
Soit une réaction enzymatique :

$$E + S \underset{V_2}{\overset{V_1}{\rightleftharpoons}} E\,S \overset{V_3}{\rightleftharpoons} E + P$$

On suppose
être en vitesse initiale : la réaction de retour E + P vers E S est alors négligeable.
être en état stationnaire : le complexe ES est constant.

⇒ la quantité S qui disparaît = quantité P qui apparaît

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt}$$

$$\Rightarrow -\frac{dS}{dt} = V_1 - V_2$$

$$V_1 - V_2 = V_3$$

$$\Rightarrow \frac{dP}{dt} = V_3$$

Selon la loi d'action de masse :

- $V_1 = k_1 [E] [S]$
- $V_2 = k_2 [E\,S]$

- $V_3 = k_3$ [E S] | k_1 [E] [S] $-k_2$ [E S]$= k_3$ [E S]

(k = constante d'équilibre)
k_1 [E] [S] = ($k_2 + k_3$) [E S]

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E]\cdot[S]}{[ES]} = K_m$$

K_m représente l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat (ou du substrat pour l'enzyme).
Plus le K_m augmente, moins le substrat a de l'affinité pour l'enzyme.
C'est la constante de Michaelis.

[E] = [E_t] - [E S] quantité d'enzyme libre = enzyme totale - enzyme complexée au substrat.

$$K_m + [S] = \frac{[E_t]\cdot[S]}{K_m + [S]} \qquad V = \frac{k_3 \cdot [E_t]\cdot[S]}{K_m + [S]} \qquad k_3 \,.\, [E_t] = V_{max}$$

$$\boxed{V = \frac{V_{\max}\cdot[S]}{K_m + [S]}}$$

L'équation permet de quantifier la réaction enzymatique à température et pH donnés. La vitesse de réaction dépend de la quantité d'enzyme, de la concentration en substrat, du K_m (caractéristique de la liaison de l'enzyme avec le substrat, inverse de l'affinité).

$K_m = \frac{[E]\cdot[S]}{[ES]}$ (constante de Michaelis)

Quand la vitesse vaut $V_{max}/2$:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}\cdot[S]}{K_m + [S]}$$

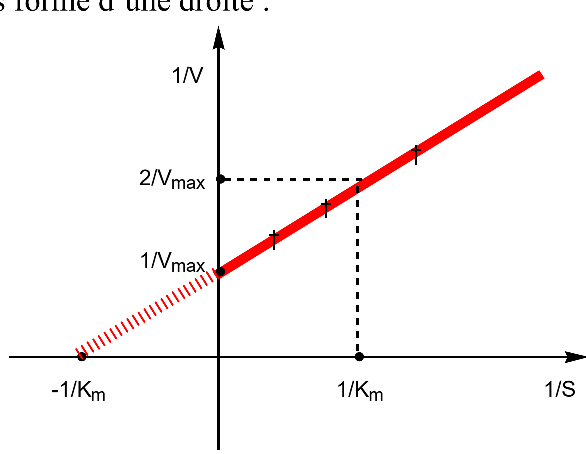
$$2\cdot[S] = K_m + [S] \qquad \Rightarrow K_m = [S] \text{ quand } V = \frac{V_{\max}}{2}$$

On peut représenter l'équation de Michaelis sous forme d'une droite :

Représentation de Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}}\left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

pente = K_m/V_{max}

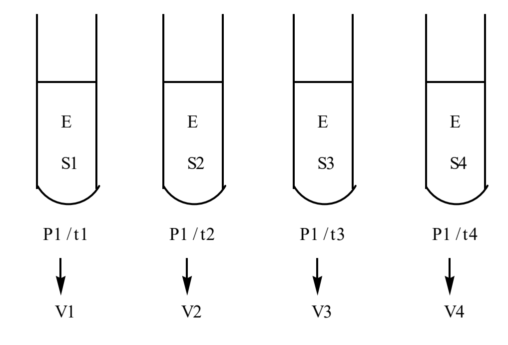


On a une enzyme : on veut calculer ses paramètres

- K_m (invariable)
- V_{max} (varie en fonction de la quantité d'enzyme)

On prend au minimum 3 tubes dans lesquels on verse la même quantité d'enzyme, mais des quantités différentes de substrat. On fait agir la réaction pendant 10 minutes puis on dose le produit.

⎡ on obtient 3 vitesses. Les concentrations en substrat sont connues ⇒ on place 3 points de la droite que l'on peut tracer et on obtient graphiquement les constantes de l'enzyme.



C1 = DO □ 1⎪ P1 = C1 . V1
⎪ on obtient V : P/t.

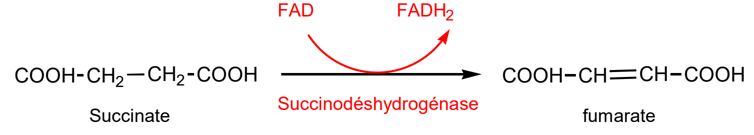
☝ il ne faut pas être à $V_{max} = V_{initiale}$

B. INHIBITION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Une inhibition n'est pas une dénaturation car elle est *réversible*. On ne peut plus retrouver d'activité après dénaturation.

1. Inhibition compétitive

L'inhibiteur a une structure voisine de celle du substrat, et se fixe sur le site actif pour former un complexe E I (réversible) au lieu de E S.
Exemple : succinodeshydrogénase :



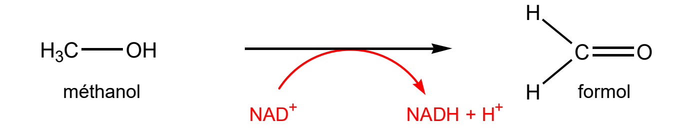
Inhibition de l'enzyme par le malonate : $COOH\text{-}CH_2\text{-}COOH$
Ce composé peut se fixer sur le site actif et empêche le succinate de prendre sa place (mais il ne peut pas subir de réaction de déshydrogénation).
⎡ réaction moins rapide.
Si on rajoute beaucoup de substrat, la probabilité que l'enzyme se combine à S plutôt qu'à I va augmenter : cela lève l'inhibition car la vitesse peut atteindre V_{max} mais avec une quantité de substrat >> quantité normale.
La présence de ce type d'inhibition baisse l'affinité de l'enzyme pour le substrat
⎪ on a donc une hausse du K_m, et une V_{max} conservée.

$$K_{m'} = K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

K_i est l'inverse de l'affinité de I pour E.
⎡ Un inhibiteur compétitif est d'autant plus puissant que son affinité pour l'enzyme est importante (parfois elle est supérieure à celle pour le substrat). La concentration de l'inhibiteur intervient également.

Exemple d'application médicale : enzyme = *alcool déshydrogénase*

- transforme le glycérol en glycéraldéhyde
- permet l'émimination de l'éthanol (alcool du vin)
- transforme le méthanol en formol, très toxique pour le système nerveux (rend aveugle puis tue)



En cas de présence de méthanol dans le sang, on perfuse de l'éthanol pour que l'alcool prenne la place du méthanol dans l'enzyme pendant que le méthanol est éliminé dans les urines.
⎡ l'éthanol est un inhibiteur compétitif du méthanol.

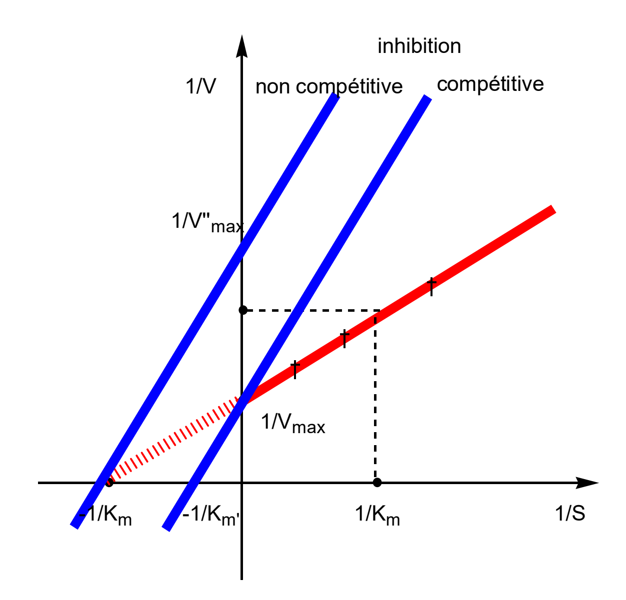
2. Inhibition non compétitive

Certaines substances diminuent l'activité enzymatique sans ressembler au substrat et si on augmente la quantité de substrat, il n'y a pas levée de l'inhibition : le site de fixation de l'inhibiteur est différent de celui du substrat.
⎡ on peut avoir les complexes EIS, EI et ES.
⎡



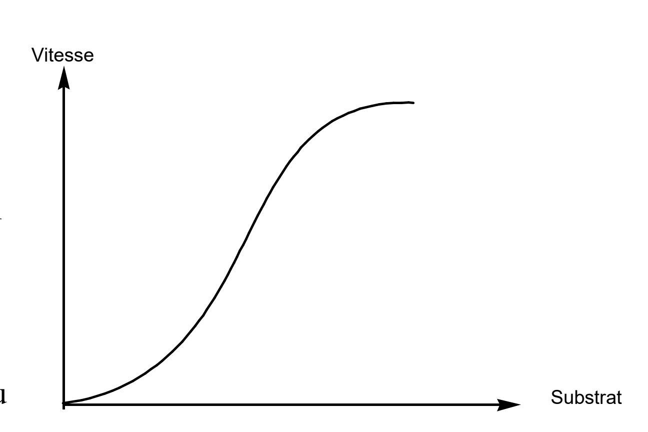
- K_m conservée
- V_{max} diminuée

$$\frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1}{V_{\max}}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)$$



On peut objectiver graphiquement ces deux types d'inhibition :

Tous ces aspects concernent les enzyme du type Michaelien dans des condition de vitesse maximale.
Or tous les enzymes ne sont pas Michaeliennes : il existe des enzymes de type *allostérique*. Leur courbe de vitesse est sigmoïde. Leurs caractéristiques cinétiques en font des éléments clés dans la régulation des activités enzymatiques des chaînes métaboliques.



C'est l'indication d'une liaison coopérative du substrat à plusieurs sites. La liaison à un site affecte les autres sites.

C. *REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE*

Une cellule ou un organisme pluricellulaire doit pour se maintenir en vie réguler réguler son métablisme et donc réguler une série de réactions chimiques catalysées. Comment cette activité enzymatique est-elle régulée ?

1. Régulation à taux d'enzyme constant

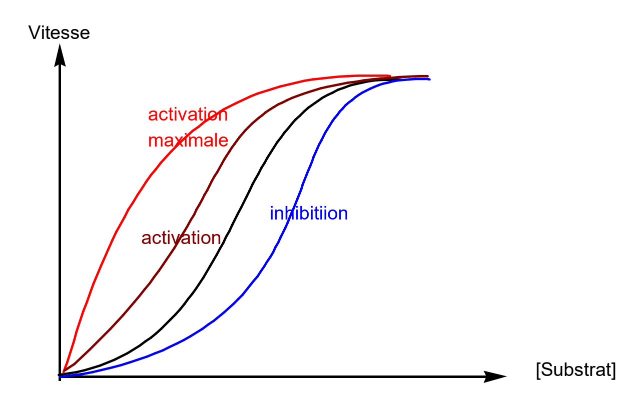
Dans ce cas, plusieurs régulations sont possibles

a) Régulation liée aux activateurs ou aux inhibiteurs allostériques

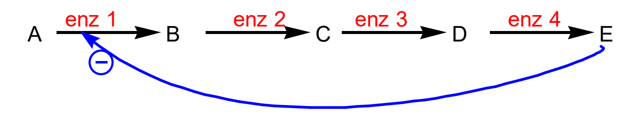
i Allostérie

:

Les enzymes allostériques ont une cinétique particulière. Pour des variations faibles de quantités de substrat, on observe d'importantes modifications de la vitesse de réaction par fortes variation de l'activité enzymatique. Ces enzymes ont des régulateurs qui n'ont de ressemblance ni avec leur substrat ni avec leurs coenzymes.
Ces régulateurs sont des *effecteurs allostériques*.
Ils peuvent être activateurs ou inhibiteurs. Les activateurs déplacent la courbe vers la gauche. Au maximum, on observe une cinétique



michaelienne. Les inhibiteurs déplacent la courbe vers la droite. On les rencontre dans les phénomènes de rétro-inhibition :



Le produit E n'a plus de ressemblance avec A, mais il rétro-inhibe l'enzyme 1.
⎡ cela maintient la réaction toujours à la même vitesse.

C'est un système de rétro-inhibition (≠ rétro-régulation : modification de la production d'enzyme)

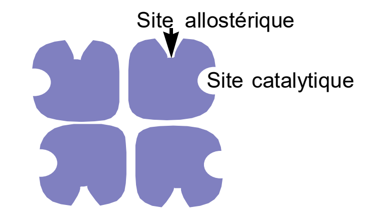
Exemple : l'ADP est l'activateur allostérique de l'isocitrico déshydrogénase, enzyme qui initie le cycle de Krebs qui permet de fabriquer de l'énergie sous forme d'ATP.
Il existe 2 types d'enzymes allostériques :

- ceux dont V_{max} peut être atteinte en augmentant la quantité de substrat même en présence d'inhibiteur : système allostérique K.
- système V où il est impossible d'atteindre V_{max} en présence de l'inhibiteur allostérique.

ii Fonctionnement du système allostérique

.

du point de vue moléculaire : l'enzyme est multimérique , formée de plusieurs sous unités identiques. Le plus souvent, il y a 4 sous-unités. Le substrat se fixe sur le site catalytique. L'inhibiteur ou l'activateur se fixent sur le site allostérique.
Cette structure permet d'expliquer la cinétique en forme de sigmoïde.



L'explication repose sur le phénomène de la coopérativité positive
la fixation d'une première molécule de substrat sur l'enzyme facilite la fixation de la deuxième molécule sur le second site. Les deux premières favorisent la fixation sur le 3° site...
⎡ la fixation du substrat sur l'enzyme favorise la fixation du substrat sur l'enzyme. C'est l'effet homotrope positif de la fixation du substrat sur l'enzyme.
Le même phénomène peut exister pour la fixation de l'inhibiteur ou de l'activateur allostérique.
✋✍ Ce phénomène de coopérativité existe également pour des molécules non enzymatiques : par exemple même forme sigmoïde de la courbe de fixation de l'O_2 sur l'hémoglobine.
Ce modèle a permis de poser 2 théories qui expliquent le fonctionnement des enzymes allostériques.

- Modèle de Monod, Wymann et Changeux (F).
  - postule l'existence de 2 formes isomères inter convertibles de chacune des sous-unités, par différence de structure quaternaire :
    - forme T tendue
    - forme R relâchée
  - postulat de symétrie : dès qu'un monomère passe sous une des deux formes, il faut que son voisin passe sous la même forme. Seule la forme R peut fixer le substrat et, selon la loi d'action de masse :



- Modèle de Koshland

plus complexe sur le plan mathématique, il utilise la transition concertée : la fixation du substrat fait passer une forme T en S, ce qui par interaction favorise le passage en 2 S, puis 3 S et 4 S. Ce modèle peut expliquer les phénomènes de coopérativité négative observés dans certaines enzymes.

R S T S S S S S S S S S S S

T4 T3 R T2 R2 T R3 R4

⎡ il n'y a pas de forme R libre : c'est la fixation du substrat sur T qui entraîne son passage à la forme R.

b) Modification des enzymes par une liaison covalente réversible

C'est une autre façon de moduler l'activité des enzymes. Il y a activation ou désactivation de l'enzyme par établissement d'une liaison covalente (souvent une liaison phosphore) par une autre enzyme : la première devient substrat de la deuxième[2*] :
ex : phosphorloyse du glycogène par la phosphorylase

Glycogène (n) + Pi —phosphorylase→ Glycogène (n-1) + G1F

La phosphorylase existe sous 2 formes :

- forme *a* active
- forme *b* inactive

2 phosphorylase b + 4 ATP ∧ 1 phosphorylase a + 4 ADP.
Le passage de b vers a est dû à l'ajout sur 2 résidus sérines de l'enzyme de 2 groupes phosphates grâce à une kinase (ce qui active l'enzyme).
Une kinase peut être activée par une autre kinase (action en cascade). Il existe des protéines kinase A (AMP_c dépendantes) et des kinases C (calcium dépendantes).

En général il y a 2 formes de protéines kinases :

- sérine ou thréonine kinase
- tyrosine protéine kinase (fixant un P sur la tyrosine) cf. récepteur à l'insuline.

Des phosphatases permettent le retour à l'état initial par déphosphorylation.
Il existe plus rarement des méthylations ou des acétylations.

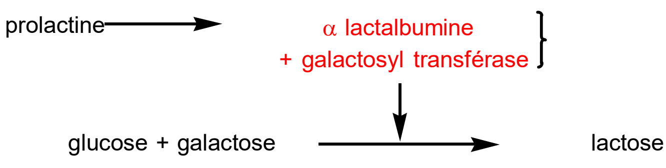
c) Modifications non covalentes

Cas de l'enzyme qui permet la synthèse du lactose : normalement, la galactosyl transférase transfère le glalactose à partir d'UDP galactose sur de la N méthylglucosamine (chaîne glucidique des glycoprotéines).
Or, à la fin de la grossesse, pendant l'accouchement, la glande mammaire va synthétiser une protéine, l'α lactalbumine qui s'associe de manière non covalente à la galactosyl transférase dans les cellules mammaires, ce qui va modifier la spécificité de l'enzyme qui va fixer le galactose sur du glucose libre pour donner le lactose qui est le sucre essentiel du lait.

- A l'état normal :

N acétylglucosamine + UDP galactose —galactosyl transférase→ glycoprotéine

- fin de grossesse :



c'est une interaction non covalente faible

2. Régulation avec modification du taux ou de la qualité d'enzyme

a) action sur la synthèse enzymatique : + ou -

Ces régulations sont moins rapide puisqu'elles nécessitent une action sur la synthèse ou la dégradation d'une enzyme (ou d'une enzyme qui en détruit une autre). Il est plus facile d'augmenter la synthèse que de diminuer la dégradation.
Il peut y avoir une activation ou une inhibition :

- L'activation peut se faire par la présence d'un substrat à transformer . Ex : β galactosidase produite chez escherichia coli. Quand la concentration en galactose augmente, la transcription et la traduction de gène augmentent.

---

* ☞ une protéine est déphosphorylée par une phosphatase et phosphorylée par une kinase.[2]

- L'inverse peut se produire : cf. HMG-CoA réductase : enzyme clé de la synthèse du cholestérol (au début de la chaîne synthétique) : le cholestérol rétro-régule négativement la synthèse de cet enzyme.
  Le cholestérol a également une action rétro-inhibitrice allostérique : bien différentier la rétro inhibition de la rétro régulation qui joue sur les gènes.

b) transformation de proenzymes

Les pro enzymes sont des protéines sans action enzymatique. Elle peuvent devenir actives après avoir subi une protéolyse limitée : le départ de quelques a.a. démasque le site actif. Cette modification est irréversible. Ex :

- **les protéases digestives** comme :
  - chymotrypsinogène qui donne la chymotrypsine par protéolyse limitée
  - trypsinogène → trypsine
  - pepsinogène → pepsine.

  Ce sont des zymogènes, activés par des protéases. Il y a souvent auto activation ; une molécule active l'autre. (on comprend qu'elles soient stockées sous forme inactive car elles pourraient détruire les propres protéines de l'organisme. L'estomac est protégé après leur activation par son épaisse couche de mucus.)
- les enzymes de la coagulation du sang, ou – à l'opposé - de la digestion du caillot.

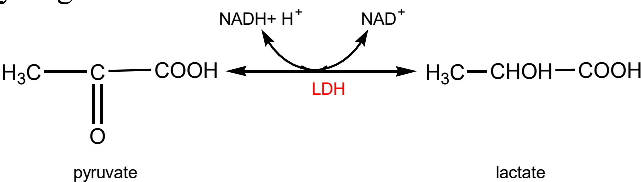
3. Application des dosages enzymatiques à la médecine

On a souvent à présenter des dosages d'activité enzymatique.

a) Notion d'isoenzyme

A l'origine, ce terme définissait 2 enzymes catalysant les mêmes réactions.
Actuellement, ce sont différentes formes d'enzymes oligomères formés de protomères différents pouvant se combiner entre eux pour former des enzymes actives : les différentes combinaisons possibles sont appelées isoenzymes.

Exemple : lacticodéshydrogènases



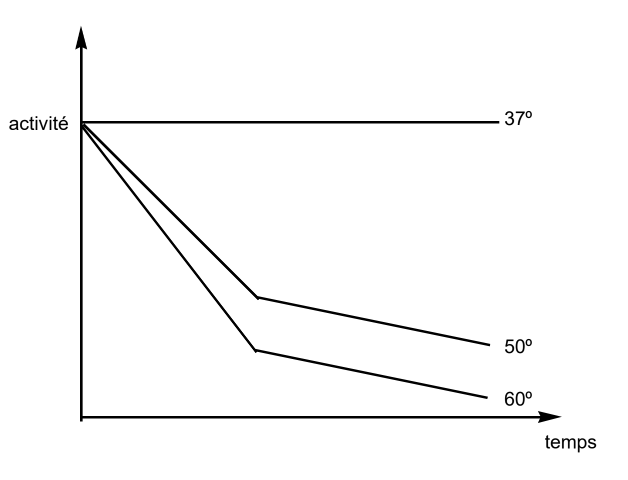
L'enzyme est formée de 4 protéines qui peuvent être de 2 types :

- type H (heart : trouvée dans le coeur)
- type M (muscle)

Il existe 5 formes d'isoenzymes la première dans le coeur, les trois suivantes dans différents organes, la dernière dans le foie et les muscles :

- HHHH : isoenzyme cardiaque
- HHHM ⎫
- HHMM ⎬ autres organes
- HMMM ⎭
- MMMM : muscles

La LDH est une enzyme intracellulaire qui se retrouve en quantité importante dans le sang en cas de cytolyse (destruction cellulaire)
en cas d'infarctus du myocarde, c'est la forme H qui sera trouvée
en cas de maladie hépatique : on trouve la forme M
⎡ il est important de pouvoir mesurer les différentes formes.
On peut faire des courbes de *dénaturation thermique*. La courbe est cassée : présence d'isoenzymes (la dénaturation survient à des températures différentes selon l'enzyme).

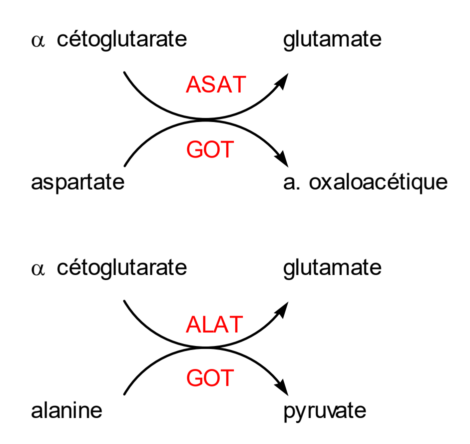


b) Exemple d'enzymes couramment dosés

i Transaminases

Elles assurent le transfert d'un groupement NH_2 d'un a.a. sur un acide α cétonique

- SGOT : aspartate amino transférase (ASAT)
- SGPT : alanine amino transférase (ALAT)



On les dose parce qu'elles apparaissent dans le sang dans des circonstances particulières (elles sont normalement dans le cytoplasme des cellules).

- cytolyse hépatique (hépatite virale) ⎡ ⬀ SGPT la plus importante.
- infarctus du myocarde ⎡ ⬀ SGOT surtout.

ii la lactate déshydrogénase

∨ dans la cytolyse On s'intéresse à l'isoenzyme HHHH qui a la particularité de pouvoir être dosé facilement car il accepte l'acide α butyrique.
| dans l'infarctus : on dose la forme cardiaque.

iii CPK

Il faut avoir une enzyme qui apparaisse rapidement après l'accident cardiaque.
Les transaminases augmentent à partir de la 10e h. seulement.
Les CPK (forme M B) apparaissent dans le sang en 4 à 5 h.
Elles catalysent la réaction Créatine + ATP ∧ Créatine phosphate + ADP.
[C'est une réaction qui intervient dans l'énergétique musculaire, mais ici elle apparaît dans le sang.]
l'enzyme existe sous forme d'isoenzymes :

- MM
- MB : spécifique du cœur
- BB.

| En cas d'infarctus : dosage des CPK MB.

iv □GT : □ glutamyl transpeptidases

Cet enzyme catalyse une réaction de transfert d'un acide glutamique sur un dipeptide : cystéinyl glycocolle.
La liaison peptidique se fait sur le □ COOH de l'acide glutamique. Cette enzyme se trouve dans les pathologies hépato-biliaires. C'est surtout un marqueur de l'alcoolisme chronique.

v Phosphatases

Elles hydrolysent les liaisons d'ester d'acide phosphorique : elles vont déphosphoryler.
On dose l'activité phosphatasique.
Deux catégories :

- phosphatases dont le pH est acide : phosphatases acides (inhibées par les tartrates).
- phosphatases dont le pH est alcalin : phosphatase alcaline.

Ces enzymes sont normalement en faibles quantités, vont augmenter dans des conditions pathologiques :

- P acides : pathologie prostatiques
- P alcalines
  - pathologies hépato - biliaires
  - pathologies osseuses : carence en vit D.

vi enzymes pancréatiques : lipase et amylase

L'amylase hydrolyse les liaisons β 1-4 glucosidiques de l'amidon alimentaire.
Elles ne sont normalement pas présentes dans le sang. En cas de pancréatite aiguë : elles augmentent de façon importante ⎡ aide au diagnostic en cas de syndrome douloureux abdominal aigu.
L'amylase pancréatique catalyse l'hydrolyse des liaisons 1-4 de l'amidon.
Les 2 enzymes n'existent à l'état normal que dans le tube digestif.

Les enzymes dans leur ensemble sont présentes à des taux faibles dans le sang à l'état normal

ENERGETIQUE

Les êtres vivants ont un besoin constant d'énergie

- pour *maintenir* en état leur milieu intérieur qui est différent du milieu extérieur (cf Na et K avec des pompes à Na et K pour maintenir les gradients)
- pour *renouveler* leurs structures cellulaires : les protéines ont une durée de vie limitée ; elles sont l'objet d'un turn over avec synthèse permanente.
- pour la *croissance* de l'organisme : nécessité de synthèse supplémentaire
- pour le *déplacement* de l'organisme
- pour maintenir une *température* intérieure supérieure à la température extérieure (pour les homéothermes)

1. Notions de thermodynamiques

L'énergie totale d'un système et de son milieu est une constante. La variation d'énergie est égale à la chaleur Q absorbée par le système moins le travail effectué.
La variation d'énergie d'un système dépend uniquement des états initial et final et non de la voie suivie.
Il est intéressant de savoir si une réaction chimique peut avoir lieu ou non.
⎜ nécessité d'introduire la notion d'entropie : représente la mesure du degré de désordre d'un système. L'entropie d'un système augmente quand il devient plus désordonné : ΔS ∨.

2 récipients remplis d'eau – un à 60°, l'autre à 20°.
2 autres sont à 40° : la quantité de chaleur dans la somme des 2 systèmes est identiques.
Pour faire effectuer un travail, il est possible en 1 pas en 2, l'entropie est trop élevée en 2.
⎜ 2° principe de la thermodynamique : un processus ne peut évoluer spontanément que si la somme des entropies du système et du milieu extérieur ∨.
Le changement d'entropie du milieu extérieur est quasiment non mesurable ∧ formulation de l'énergie libre G en calories : la variation d'énergie libre $\Delta G = \Delta H - T . \Delta S$

si on suppose la variation d'énergie d'un système à température et pression constantes et qu'on ne parle pas du milieu extérieur, on peut écrire :

$$\Delta H = \Delta E + P \Delta V$$

entha ↖ énerg ie

comme la température et la pression sont constantes :
$\Delta G = \Delta E - T. \Delta S$

La variation d'énergie libre ΔG permet de savoir si la réaction peut se produire spontanément : ΔG doit être négatif.

ΔG est indépendant de la voie suivie et du mécanisme de réaction - ne donc aucune indication sur la vitesse de la réaction.

Il est important de connaître les rapports de la variation de l'énergie libre standard ΔG par rapport à la constante d'équilibre d'une réaction.

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

On mesure la variation d'énergie libre :

$$\Delta G = \Delta G'_0 + RT.\ln\frac{[C][D]}{[A][B]}$$

A l'équilibre ΔG = 0

$$\Delta G'_0 = -RT.\ln\frac{[C][D]}{[A][B]} = -RT\ln K_{eq}$$

constante d'équilibre

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = k_{eq}$$

Pour passer en log10 : on multiplie par 2,3

Dans toutes les réactions on parle en général de $\Delta G'_0$ d'une réaction. En toute rigueur, le critère de spontanéité de la réaction est ΔG.

$\Delta G'_0$ est la valeur qu'on utilise car elle est connue : constante d'une réaction donnée.

Unités : en général en calories

c'est la quantité de chaleur nécessaire pour augmenter la température d'un gramme d'eau de 14,5 °c à 15,5°c .

autre unité : joule.

1 cal = 4,18 joules.

2. Processus du couplage énergétique

Pour une réaction à ΔG > 0 : ne peut pas se produire spontanément.

On va la coupler avec une réaction à ΔG < 0 de façon à ce que la réaction puisse se produire :

Pour une synthèse :

$$A \rightleftharpoons B + C$$

soit $\Delta G'_0 = +6$ kcal / mol.

Cette réaction (endergonique) ne pourra pas se faire spontanément (ex : création de chaîne d'a.a.). L'organisme la couple à une autre ayant $\Delta G_{0'} < 0$ (exergonique) :

$$B \rightleftharpoons D$$

$\Delta G'_{0'} = -9$ kcal

$$A \rightleftharpoons C + D$$

$\Delta G'_{0'} = -3$ kcal

Ce processus de couplage énergétique est un des phénomènes fondamentaux de la chimie des êtres vivants. Il apporte l'énergie nécessaire au processus de biosynthèse, au fonctionnement des pompes ioniques et aux phénomènes de contraction musculaire.

l'énergie est obtenue grâce aux processus chimiques :

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

3. Base moléculaire du couplage énergétique

Une molécule fondamentale possède des propriétés particulières : riche en énergie et facilement hydrolysable, utilisable pour les réactions de couplage : c'est l'ATP - Adénosine Triphosphate. 7,3 kcal / mol.

Adénine — Ribose — $P(=O)(O^-)$ — O ~ $P(=O)(O^-)$ — O ~ $P(=O)(O^-)$ — OH

Les liaisons riches en énergie sont des liaisons anhydride d'acide (anhydride d'acide phosphorique) : elles sont formées par élimination d'une molécule d'eau.

D'autres types de liaison riches en énergie sont rencontrées dans le métabolisme :

- groupement acyl-thiol (cf. acétyl-CoA)

—C(=O)—OH   H—S ⟶ —C(=O)~S + H_2O

- liaison phosphate d'énol : dans le phopho énol pyruvate (dans la glycolyse) -14,8 kcal

COO^- — C(=CH_2) — O ~ $P(=O)(O^-)$ — OH

- Liaison phosphoamine dans la créatine phosphate (réserve énergétique du muscle) : -10,3 kcal

la formule n'est pas à savoir :

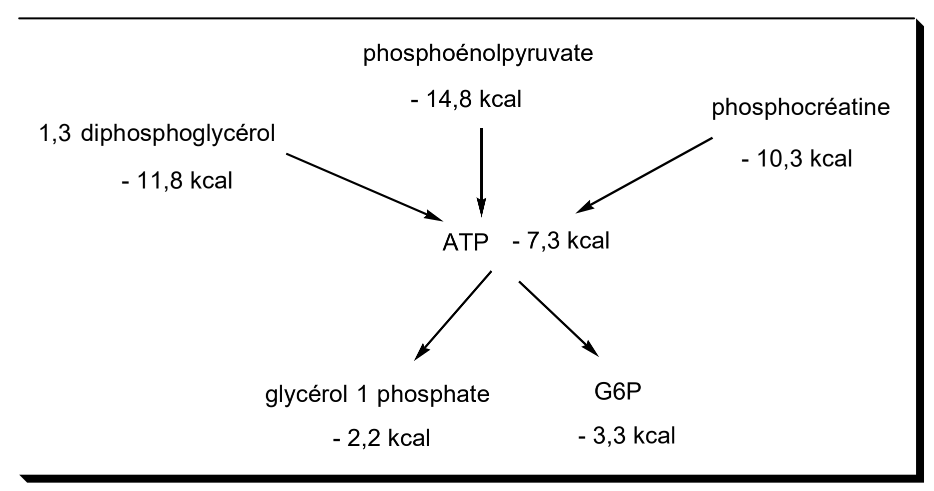
HN=C(—NH ~ $P(=O)(O^-)$—OH)—N(CH_3)—CH_2—COO^-

présence d'une liaison phospho-amine

La particularité de ces liaisons

- richesse en énergie (toutes les liaisons sont riches en énergie)
- facilement hydrolysables : se rompent facilement : c'est la caractéristique essentielle.
-

L'ATP occupe une position centrale. Il a une valeur médiane par rapport aux autres composés riches en énergie. C'est plus un intermédiaire donneur d'énergie qu'une forme de mise en réserve de l'énergie : l'ATP est en général consommée dans la minute qui suit sa formation. Elle est constamment régénérée dans l'organisme à partir de l'ADP (on consomme 40 kg d'ATP par jour alors qu'on en possède quelques grammes).



⎡Dans la famille des molécules qui ont une liaison énergétique, l'ATP a une place centrale.

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + Ⓟ \qquad \Delta G = -7{,}3 \text{ kcal / mol}$$

Il peut se coupler avec une réaction ayant un □G'₀ inférieur à – 7,3 kcal.
Pour le phosphoénol pyruvate :

$$PEP \rightleftharpoons \text{pyruvate} + Ⓟ \qquad \Delta G = -14{,}8 \text{ kcal / mol}$$

Pour le G6P :

$$G6P \rightleftharpoons \text{Glucose} + Ⓟ \qquad \Delta G = -3{,}3 \text{ kcal / mol}$$

| les liaisons riches n'ont pas toutes la même valeur.

- celles ayant un $\Delta G < \Delta G_{ATP}$ pourront synthétiser de l'ATP,
- les autres pourront être crées grâce à l'ATP.

Beaucoup de réactions vont servir à synthétiser de l'ATP et d'autres sont couplées à l'ATP pour permettre une synthèse : la plupart des opérations de synthèse utilisent de l'ATP ou des molécules voisines guanosine triphosphate, uridine triphosphate, cytidine triphosphate (GTP, UTP, CTP) qui peuvent s'interconvertir.
L'organisme a des mécanismes qui permettent l'interconversion par la *nucléotide diphosphate kinase*.
Le ΔG est très faible :

nucléoside diphospate kinase

ATP + UDP ⟷ UTP + ADP

ATP + GDP ⟷ GTP + ADP

ATP + CDP ⟷ CTP + ADP

(la réaction fonctionne dans les deux sens).

C'est l'ATP qu'on couple aux réactions de synthèse et qui permet

- de synthétiser les protéines
- de faire fonctionner les pompes
- de contracter les muscles..

⎡ le problème du métabolisme énergétique est de fabriquer l'ATP (qui est immédiatement utilisé : 40 kg sont synthétisés par jour).
Les principales sources d'ATP proviennent du catabolisme des glucides : du glucose et des lipides : des acides gras.
Ce catabolisme a lieu dans la mitochondrie essentiellement.

- pour les acides gras : β oxydation
- elle s'y finit : dégradation des glucides après décarboxylation de l'acide pyruvique.

L'énergie que l'on utilise provient essentiellement des glucides et des lipides : énergie présente à l'intérieur des liaisons chimiques. Les plantes les dégradent et peuvent les synthétiser. L'énergie leur est apportée sous forme de photons grâce à la photosynthèse. L'homme dégrade les molécules synthétisées par les plantes.
Quelques ATP sont formés directement lors de certaines réactions du métabolisme, mais la majorité sont formés par l'oxydation des groupements H des formes réduites des coenzymes FAD (FADH + H^+) et NAD (NADH + H^+) au niveau de la mitochondrie.
| la *mitochondrie* est la centrale énergétique de la cellule.

4. Le cycle de KREBS.

C'est la partie du métabolisme commune aux lipides et aux glucides, ainsi qu'à la fraction carbonée de certains aa. C'est le cycle tricarboxylique. Il va fournir un nombre important de coenzymes réduits.

a) Description

Le produit d'entrée dans ce cycle est *l'acétyl-CoA* qui provient

- directement de la β oxydation des acides gras
- du métabolisme glucidique par décarboxylation *irréversible* de l'acide pyruvique. La décarboxylation est une réaction mitochondriale. Elle a des conséquences diététiques importantes : quand on aboutit à l'acétyl-CoA, on ne peut plus fabriquer des sucres ⎡ quand excès de glucides, on fabrique des graisses.

Le produit terminal de la glycolyse est l'acide pyruvique :

Glycolyse → $H_3C-C(=O)-COO^-$ (acide pyruvique) → $H_3C-C(=O)\sim S-CoA$ (acétylCoA) + CO_2

(NAD^+ → NADH, H^+ ; CoASH → CoA ; pyruvate déshydrogénase)

L'enzyme est un **complexe multi-enzymatique** appelé *pyruvate déshydrogénase*. Il a besoin pour fonctionner de 5 coenzymes :

- NAD^+ (qui donne NADH, H^+)
- CoASH
- Thiamine pyrophosphate pour la décarboxylation
- Acide lipoïque et FAD comme transporteurs d'H.

⎡ obtention du premier CO_2 qui va être éliminé par le sang et la respiration.

Dans le cycle de Krebs :

- entrée d'un composé à 2 C : acétyl-CoA
- élimination de 2 C sous forme de CO_2
- formation de 1 molécule de $FADH_2$
- formation de 3 molécules de NADH + H^+
- par l'intermédiaire de GTP : formation d'une liaison riche en énergie.

La molécule d'acétyl-CoA se condenser sur un composé à 4 C, l'oxaloacétate pour obtenir un composé à 6 carbones, tricarboxylique (3 fonctions COOH) qui caractérise et a donné son nom au cycle : *le citrate* (la molécule est partiellement ionisée).

- L'enzyme est la citrate synthétase.
- L'énergie de la formation vient de la liaison riche en énergie de l'acétyl-CoA.

La molécule ne peut pas être directement utilisée : il va se produire une isomérisation en 2 étapes grâce à une aconitase : ∧

- départ d'une molécule d'eau qui donne l'acide cis aconitique
- puis retour d'une molécule d'eau ⎡ on obtient l'isocitrate : isomère de l'acide citrique (déplacement d'un OH).

Une *déshydrogénation* se fait grâce à l'isocitricodéshydrogénase (le coenzyme accepteur d'hydrogène est NAD).

∧ composé instable, l'acide oxalosuccinique qui se décarboxyle immédiatement.

∧ libération d'un CO_2 qui est rejeté : on obtient l'acide α cétoglutarique.

On a ensuite une réaction qui ressemble à la décarboxylation de l'acide pyruvique : décarboxylation oxydative par un comple multi-enzymatique, l'α cétoglutarate déshydrogénase, avec la participation de 5 coenzymes : NAD, FAD, acide lipoïque, Thiamine Pyrophosphate et CoA.
∧ on obtient le succinylCoA. composé en C 4. Dès cette étape du cycle, on a éliminé les 2 C rentrés sous forme d'acétyl-CoA

Grâce à une succinyl thio kinase en présence de GDP + Pi ∧ GTP on obtient l'acide succinique.

GTP comprend une liaison riche en énergie. Il pourra se transformer rapidement en ATP (par la nucléoside diphosphate kinase, qui fonctionne dans les 2 sens).

L'acide succinique peut être déshydraté grâce à la succino-déshydrogénase (coenzyme : FAD)
∧ on obtient le fumarate (ou acide fumarique).

Sur le fumarate se fixe une molécule d'eau ∧ malate sous l'action de la fumarase.

Enfin, la malate déshydrogénase (coenzyme NAD) permet de retrouver le composé de départ l'oxaloacétate.

⌈ le cycle est bouclé – il peut recommencer.

Dans cette zone de la mitochondrie, une 2e molécule d'acétyl-CoA va venir se condenser sur une molécule d'oxaloacétate pour donner le citrate, etc...

b) Bilan

Un composé à 2 C est entré dans le cycle : acétyl CoA, branché sur un composé à 4C.
2C sont éliminés dans le cycle sous forme de CO_2

- décarboxylation spontanée de l'acide oxalosuccinique
- une au cours de la déshydrogénation de l'α cétoglutarate.

On obtient directement à partir de succinyl CoA une molécule riche en énergie, GTP qui peut se transformer immédiatement en ATP.
3 molécules de NADH + H^+ se sont formées :

- par iso citrico déshydrogénase
- par l'α cétoglutarate déshydrogénase
- par la malate déshydrogénase

1 molécule de FADH + H^+.
Les H seront transférés au niveau de la chaîne respiratoire

∧ 3 ATP par molécule de NADH + H^+

∧ 2 ATP par molécule de FADH + H^+.

| 12 ATP sont formés par un tour du cycle de Krebs.

On peut dire qu'on a complètement détruit et oxydé la molécule d'acétyl-CoA[3]. On a obtenu à partir de l'acétyl-CoA 2 CO_2 (la réaction qui conduit du pyruvate à l'acétyl-CoA ne fait pas partie du cycle de Krebs).
Grâce à la chaîne respiratoire, on peut réoxyder

- le NADH + H^+ en NADH et H_2O et former 3 ATP par molécule ∧ 9 ATP
- FADH a un potentiel redox plus faible ∧ 2 ATP

⌈ 12 ATP par acétyl-CoA avec un tour du cycle.

---

[3] en fait on brûle le CO_2 de l'oxaloacétate.

Le cycle de Krebs a pour but de récupérer l'énergie sous forme de réducteurs

Le cycle de Krebs ne peut fonctionner que si la chaîne respiratoire fonctionne (sinon $NADH_2$ n'est plus recyclé, ne peut pas être ré-oxydé). ⌈ ne peut fonctionner qu'en aérobiose.

c) Régulation du cycle de Krebs

Le cycle a pour but de fabriquer de l'ATP.

- *L'ATP est un inhibiteur allostérique de la citrate synthétase* (1[erre] enzyme provoquant la condensation).

  ⌈ si l'ATP s'accumule, on a une répression du cycle car cela signifie que l'ATP n'est pas utilisé.
- A l'opposé, l'ADP est un activateur allostérique de l'isociticodéshydrogénase. Si il y a beaucoup d'ADP, cela signifie que l'ATP a été utilisé ⌈ il faut activer le cycle pour produire l'ATP.

d) Voies métaboliques qui se branchent sur le cycle de Krebs

- Le cycle est aussi fortement impliqué dans d'autres métabolismes : celui des acides aminés notamment des chaînons carbonés. Par exemple des acides aminés peuvent entrer dans le cycle de Krebs grâce à des transaminases :
  - ◊ acide glutamique ∧ acide α cétoglutarique
  - ◊ acide aspartique ∧ acide oxaloacétique

  notamment dans les réactions de néoglucogenèse

⌈ rôle amphitotique du cycle de Krebs : permet l'oxydation complète des a. gras et des glucides mais participe également au métabolisme des cupules carbonées des aa notamment dans les réactions de néoglucogenèse.

- La β oxydation des acide gras conduit normalement à l'acétyl-CoA. Les AG à nombre impair de carbones aboutissent au propionyl-CoA : CH_3 - CH_2 - CO ~ SCoA.
- Pour éliminer ce composé et le faire entrer dans le cycle, il est carboxylé : synthèse qui nécessite de l'énergie (ATP) ∧ succinyl-CoA :

CH_3—CH_2—CO~SCoA

CO_2 Biotine Propionylcarboxylase ATP ADP + Pi →

D méthylmalonyl-CoA : CH_3 / H—C—COO^- / CO~SCoA

↓ méthylmalonyl-CoA racémase

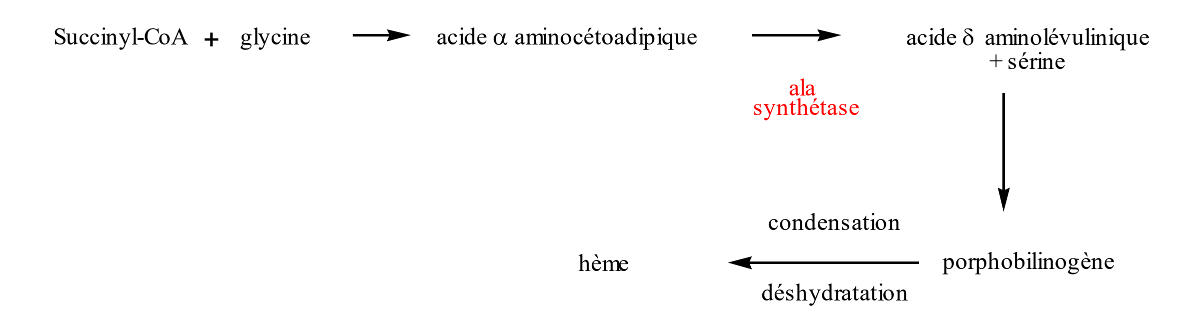
L méthylmalonyl-CoA : CH_3 / ^-OOC—C—H / CO~SCoA

← méthylmalonyl-CoA isomérase

COOH / CH_2 / CH_2 / CO~SCoA

Succinyl-CoA

Certains composés du cycle de Krebs peuvent être impliqués dans des synthèses :
Le succinyl CoA, quelle que soit son origine peut être utilisé comme précurseurs de l'hème qui fixe l'atome de fer de l'hémoglobine.
On peut synthétiser l'hème à partir de succinyl-CoA qui se condense sur une glycine :

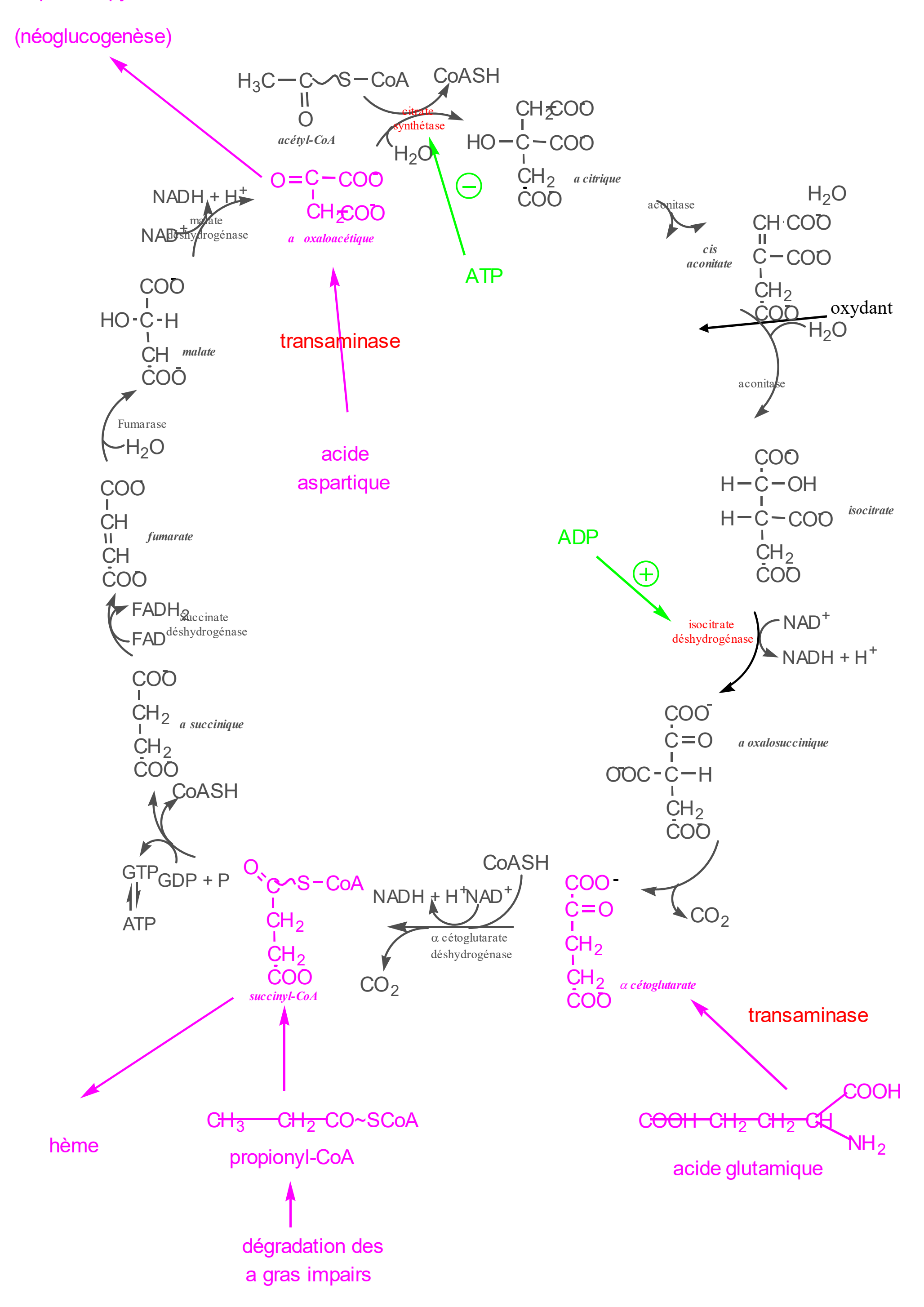


⎡ le cycle de Krebs a un rôle normalement catabolique sur le succinyl-CoA et également un rôle anabolique, c'est pourquoi on parle du caractère *amphitotique* du cycle.

- L'oxaloacétate peut, en présence de GTP, grâce à une phosphoénolpyruvate carboyxykinase donner du phosphoénolpyruvate + CO_2 + GDP ∧ néoglucogenèse.

Elle peut se faire en 2 temps : on fabrique du pyruvate dans la mitochondrie. En condensant un CO_2 on aboutit à l'oxaloacétate.
l'oxaloacétate sort de la mitochondrie et peut donner du PEP.

Le citrate dans certaines circonstances peut sortir de la mitochondrie et redonner de l'acétyl CoA et de l'oxaloacétate, par une enzyme appelée ATP citrate kinase (consomme de l'ATP) quand la cellule a besoin d'acétyl CoA pour synthétiser des AG.
⎢ le cycle de Krebs est très important pour la synthèse d'ATP à partir des glucides et des lipides. C'est aussi un carrefour métabolique important sur lequel peuvent se brancher de grandes voies de synthèse et de dégradation : acides aminés, résidus d'acides gras à nombre impair de carbone, synthèse de l'hème pour les GR, sortie du citrate pour la synthèse des AG qui se fait dans le cytoplasme mais pas dans la mitochondrie.



interactions - régulation du cycle de Krebs.

5. Devenir des NADH2 et FADH2 formés

a) Rappel d'oxydo-réduction :

il existe des donneurs d'e⁻ et des accepteurs d'e⁻ :

$$\text{donneur d'e}^- \rightleftharpoons \text{accepteur d'e}^- + n\,e^-$$

$$\text{réducteur} \rightleftharpoons \text{oxydant} + n\,e^-$$

Avec un couple oxydo-réducteur, on peut mesurer une ddp à l'aide d'une électrode. L'équation de Nernst permet de faire la liaison entre des variations de potentiel et des variations de concentration d'accepteur ou de donneur d'e⁻.

$$E = E_o^{'} + \frac{2{,}303 \cdot RT}{nF} \bullet \log \frac{accepteur \quad d'e^-}{donneur \quad d'e^-}$$

L'équation de Nernst exprime la relation existant entre le potentiel standard redox d'un couple redox et le potentiel réellement mesuré et le rapport des concentrations du donneur et de l'accepteur.

A partir de cette équation on peut faire une liaison entre des variations d'énergie libre et des variations de potentiel : important pour comprendre ce qui se passe au niveau de la chaîne respiratoire.

$\Delta G_o^{'}$ est la variation d'énergie libre

$\Delta G_o^{'} = -RT \quad \ln \quad K_{eq}$

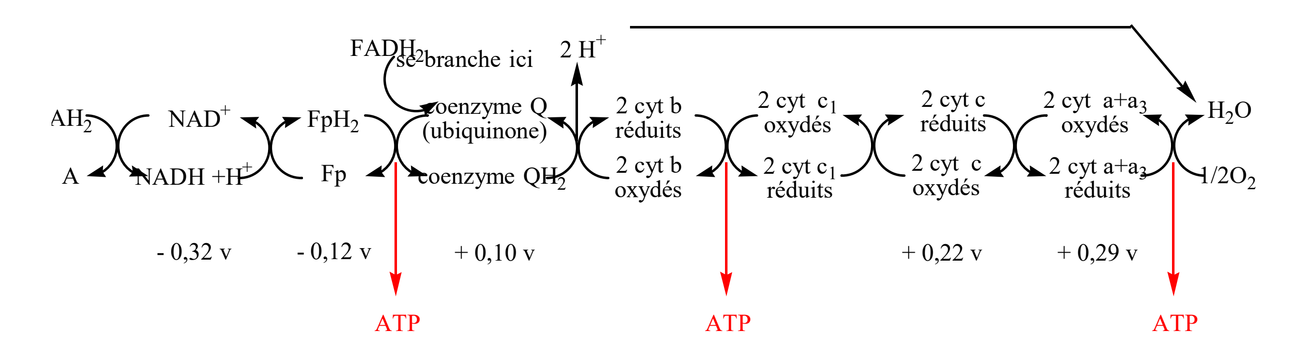
On peut exprimer $\Delta G_o^{'}$ en fonction du potentiel redox :

$$\Delta G_o^{'} = -nF\Delta E_0^{'}$$ ← réducteur

⌈ à une ddp correspond une variation de ΔG (énergie libre) : c'est ce qu'il faut retenir.
Au cours de la chaîne respiratoire, on aura d'abord des transferts d'hydrogènes puis des transferts d'électrons.

b) Différentes étapes de la chaîne respiratoire permettent l'oxydation des équivalents réducteurs formés lors du cycle de Krebs.

Soit une réaction de déshydrogénation ayant comme coenzyme le NAD^+ :



- La molécule AH_2 est déshydrogénée, l'accepteur d'hydrogène est NAD^+ ∧ NADH + H^+. Les 2 H sont transférés au niveau de la chaîne respiratoire qui se situe sur la membrane interne dela mitochondrie.
- une *flavoprotéine* (protéine contenant comme facteur coenzymatique un coenzyme à base de flavine) oxydée va être réduite en flavine hydrogénée par transfert des H provenant du NADH,$H^=$. Le NAD est régénéré ; il pourra être utilisé dans le cycle tricarboxylique par exemple.
- La flavoprotéine va transférer son hydrogène sur le coenzyme Q (famille des ubiquinones) on transfère les 2 H provenant de la flavoprotéine : le coenzyme Q est réduit en coenzyme QH_2.
- A partir de ce moment, l'hydrogène moléculaire est scindé en 2 protons et 2 électrons.
- le coenzyme élimine 2 H^+ et les 2 e^- vont être transférés sur des cytochromes : molécules possédant un noyau héminique et un atome de fer qui accepte les e^- en passant de l'état oxydé Fe^{3+} à l'état réduit Fe^{2+}. Comme il y a 2 e^- à prendre en charge, il faut que 2 molécules de cytochrome interviennent.

le premier cytochrome qui intervient est le cytochrome b : 2 cytochromes b oxydés vont accepter les 2 e^- ∧ cytochromes b réduits. Toute une cascade de cytochromes intervient dans le but de faire perdre à chaque étape un peu d'énergie à ces 2 e^- : cyt c_1, c puis (a + a_3). Cette oxydation ménagée permet la formation d'ATP.

- A la dernière étape, intervient l'oxygène respiratoire sous forme de ½ O_2 formant une molécule d'H_2O.

⌈ l'oxygène pris par les poumons et transporté dans le sang par l'hémoglobine sert à former une molécule d'eau.

Potentiels d'oxydoréduction des différents couples de la chaîne respiratoire
Le potentiel de référence est une électrode à hydrogène :

- - 0,32 v entre la forme oxydée et réduite du NAD
- - 0,12 v pour Fp
- + 0,10 v pour coenzyme Q. Le FAD intervient à ce niveau.

Les potentiels sont assez faibles sur les cytochromes suivants :

- + 0,22 v pour cyt c
- + 0,29 v pour cyt (a + a_3)
- + 0,82 v pour l'O_2.

tout au long de la chaîne respiratoire, les e^- perdent peu à peu de l'énergie jusqu'à former les molécules d'eau.
C'est parce que cette perte d'énergie est progressive et lente qu'on pourra récupérer de l'énergie. Si on met de l'hydrogène et de l'oxygène en présence, on a une oxydation explosive. Ici, l'oxydation est ménagée.
Les endroits où l'ATP peut se former : entre :

- Flavoprotéine et coenzyme Q
- cyt b et cyt c
- cyt (a + b) et H_2O

Les enzymes impliquées
Cette série de réactions se déroule dans la membrane interne de la mitochondrie.
Elles sont catalysées par 4 complexes multi-enzymatiques :

- *<u>NAD réductase</u>*
- *complexe <u>succinate - Q réductase</u>*. (la succinate déshydrogénase du cycle de Krebs se situe au contact de la membrane interne de la mitochondrie au niveau où se trouve le coenzyme Q ∧ nom du complexe. Le $FADH_2$ formé est immédiatement repris par la chaîne)
- *<u>ubiquinone - cytochrome c oxydoréductase</u>* : transfert des e^- sur la première partie des cytochromes.
- *<u>cytochrome oxydase</u>* : ∧ oxydation des derniers cytochromes.

Bilan énergétique de la chaîne respiratoire
Si on applique l'équation de Nernst :
$$\Delta G'_o = -nF\Delta E'_0$$
$\Delta E'_0 = 1{,}14v$ (0,32 v ∧ + 0,82 v)
⌈ libération d'énergie ΔG de - 52,6 kcal /mol.
Les expériences de consommation d'oxygène rapportée à la production d'ATP ont montré que 3 ATP seulement sont formés.
Or, $\Delta G'_{o\,ATP} = -7{,}3 \ {kcal}/{mol}$
soit pour 3 ATP 21,9 kcal /mol.
⌈ rendement de 41 % ce qui est excellent (le meilleur moteur thermique a un rendement < 10 %)

c) Mécanisme de la formation d'ATP

i Hypothèse chimique

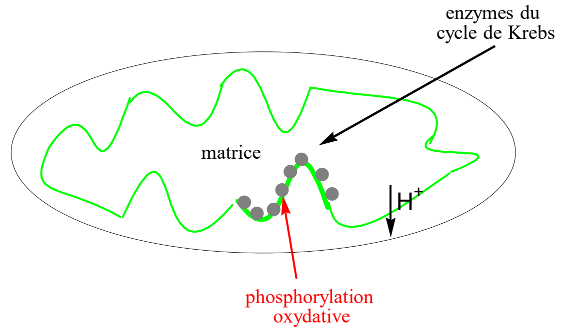
On a cherché à savoir s'il y avait pour la production d'ATP un couplage comme celui qui permet le passage PEP ∧ pyruvate :

$$AH_2 + B + C \rightleftharpoons A{\sim}C + BH_2$$

A partir d'une substance hydrogénée, la réaction fait apparaître une liaison riche en énergie.
L'hydrogène a été transféré sur B

$$A{\sim}C + Pi + ADP \rightleftharpoons A + C + ATP$$

⌈ on a cherché en vain ce composé C permettant le couplage. On pense actuellement qu'il n'y a aucun intermédiaire chimique de couplage permettant la formation d'ATP.
| **Hypothèse chimio-osmotique** : fondée sur l'architecture de la mitochondrie (mise au point par Mitchell)



La mitochondrie est constituée d'une double membrane

- membrane interne : imperméable à la plupart des ions, : c'est là que se déroule la chaîne respiratoire. Elle comprend des petits bourgeonnements formés de protéines appelées ATPase F_1 sont le rôle est de former de l'ATP.
- espace intermédiaire
- membrane externe perméable aux ions et aux petites molécules.
- matrice au sein de laquelle se touvent les enzymes du cycle de Krebs.

Les mitochondries en fonctionnement consomment de l'O_2 et rejettent du CO_2 : par le cycle de Krebs.

Expérimentalement :

- Si on traite la mitochondrie par un détergent qui détruit la membrane externe : pas de formation d'ATP.
- Si on fait éclater la mitochondrie (aux ultrasons), elle reforme des vésiculeset les fragments fonctionnent
- Il existe un <u>gradient de pH</u> : pH bas entre les membranes, et il existe une <u>ddp</u> entre les membranes.

ii ⌈ théorie chimio-osmotique de Mitchell :

le transfert des e^- à travers la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP sont couplés à un gradient de protons et non à un intermédiaire riche en énergie. Le transfert des e^- à travers la chaîne respiratoire a pour effet de pomper des protons de la matrice vers la face externe de la membrane interne, créant un gradient de protons entre les 2 faces de la membrane interne, donc une accumulation d'énergie qui sera utilisée pour former de l'ATP dans le complexe ATPasique.(les petites unités phosphorylantes de la membrane interne).

(Il a été difficile de mettre en évidence le gradient de H^+ puisque dans la mitochondrie qui respire, ce gradient se détruit à mesure qu'il se crée).

⌈ il existe des pompes à protons.

Où se situe le gradient de proton ?

on a comparé les rendements en ATP des $NADH_2$, $FADH_2$ acide ascorbique (substance directement oxydée au niveau des cytochromes) en fonction des consommations d'O_2.⌈ pour ½ O_2 on a :

- 3 ATP avec $NADH_2$
- 2 ATP avec $FADH_2$
- 1 ATP avec ascorbate (oxydé au niveau du cyt c.

Des inhibiteurs de flux d'électrons :

- roténone (insecticide naturel) et Amytal : bloquent le développement de la chaîne respiratoire à son début.
- Antimycine (antibiotique particulier) : bloque la chaîne entre cyt b et cyt c_1.
- la formation d'eau est bloquée par le cyanure et oxyde de carbone CO.

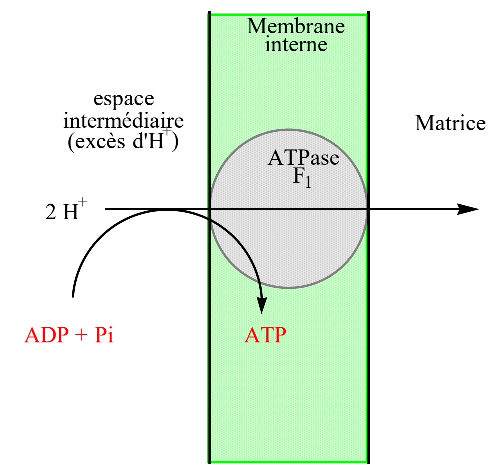
Le fonctionnement des pompes à H^+ demande une certaine quantité d'énergie : si on considère les ΔG de chacune des étapes on à montré que grâce à une orientation particulière de la membrane, on a des pompes à protons dans les complexes :

- n° 1 :NADP réductase
- n° 3 : ubiquinone - cytochrome c oxydoréductase
- n° 4 : cytochrome oxydase.

| A chaque site de pompe à H^+ correspondrait un site de formation d'ATP.

Comment le gradient de H^+ est-il transformé en ATP ?

Au niveau des protubérances sur les crêtes de la membrane interne se situent les unités phophorylantes. Elles sont formées d'ATPase F_1 Le gradient de protons s'annule à ce niveau pour former l'ATP, vraisemblablement par changements conformationnels de l'ATPase F1.



Les expériences suivantes en apportent la preuve :

- ajout d'ion H^+ dans espace intermédiaire ∧ ATP.
- inhibition de ATPase F_1 (qu'on pourrait appeler ATP synthétase) par des agents découplants modifiant la perméabilité de la membrane interne (DNP : dinitrophénol, arsenic) ∧ absence de formation d'ATP sans que la chaîne respiratoire soit arrêtée : production de H_2O et de chaleur, mais pas d'ATP. De même avec les hormones thyroïdiennes : le découplage physiologique existe chez les animaux à sang chaud, ∧ ∨ chaleur)
- destruction du cloisonnement membranaire arrête la formation d'ATP.

d) Transport de ATP et NADH

⌈ le système fonctionne grâce à l'imperméabilité de la membrane interne de la mitochondrie. Cependant, l'ATP est formé dans la membrane interne et utilisé en dehors (par exemple pour les synthèses protéiques). Comment faire sortir l'ATP synthétisé hors de la mitochondrie ? De même, il existe des $NADH_2$ formés en dehors de la mitochondrie (par exemple dans le cytoplasme, par l'action de la triose phosphate déshydrogénase dans la glycolyse). Or la membrane interne est imperméable au $NADH_2$.

i Il existe des transporteurs de nucléotides : d'ATP et d'ATP.

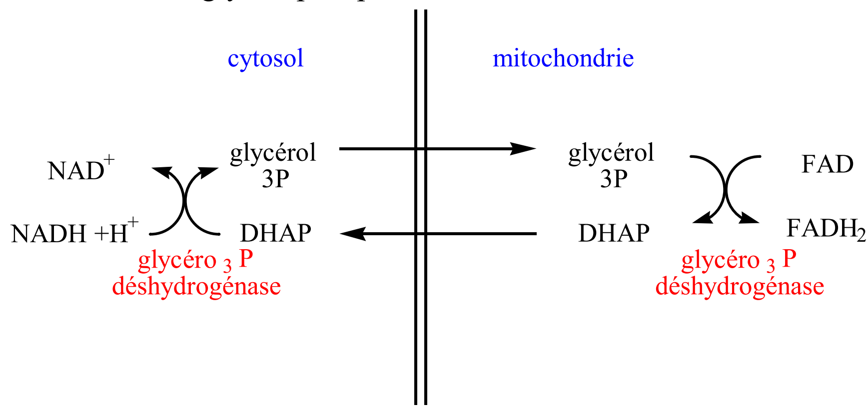
Ils sont situés dans la membrane interne : ils permettent la sortie de l'ATP de la mitochondrie contre l'entrée d'une molécule d'ADP.
Eu même moment, un autre transporteur permet l'entrée d'un ion phosphate $H_2PO_4^-$ contre la sortie d'un OH^-

| tout est prêt pour une nouvelle synthèse d'ATP.

ii Le problème du transport du $NADH_2$ est réglé par un système de navettes.

Les navettes font pénétrer des équivalents réducteurs du cytoplasme dans la mitochondrie. (les $NADH_2$ du cycle de Krebs sont déjà dans la mitochondrie et ne sont donc pas concernées)

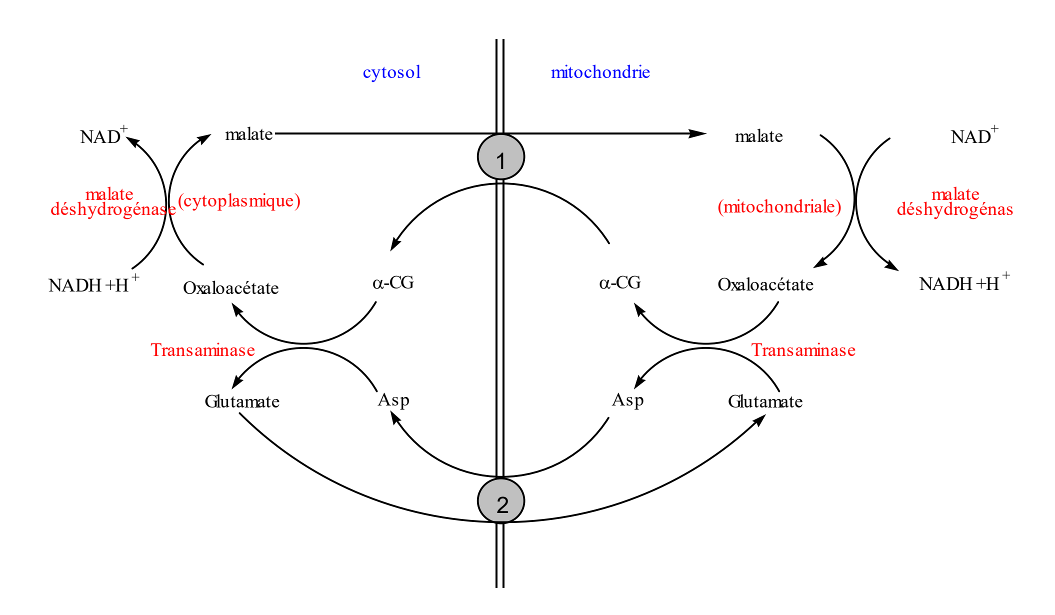
♥ navette à glycérophosphate



DHAP = dihydroxyacétonephosphate.

Il existe une glycéro 3P déshydrogénase cytoplasmique permettant le transfert des H du $NADH_2$ sur le glycérol (l'enzyme fonctionne dans les 2 sens).
Le glycérol 3 P peut franchir la membrane mitochondriale grâce à un transporteur.
Il existe également dans la mitochondrie une glycéro 3P déshydrogénase, redonnant DHAP.
Le FAD est le seul accepteur possible pour le glycérol 3P.
DHAP peut retourner dans le cytoplasme par un transporteur.
Cette navette est désavantageuse sur le plan énergétique car $NADH_2$ fournit potentiellement 3 ATP, alors que $FADH_2$ ne peut fournir que 2 ATP.

♥ navette à malate



Navette du malate

Elle a également pour but de faire pénétrer dans la mitochondrie des équivalents réducteurs pour pouvoir les oxyder dans la chaîne respiratoire.
L'accepteur est l'oxaloacétate sur lequel sont transférés les 2 H de la molécule de NADH, H^+ grâce à une enzyme : la malate déshydrogénase.
Les malate déshydrogénases ont un faible ΔG : elles fonctionnent dans les 2 sens en fonction des concentrations.
Le malate peut entrer dans la mitochondrie grâce à un transporteur ①.
Le malate dans la mitochondrie - par une malate déshydrogénase mitochondirale - redonne l'acide oxaloacétique avec comme accepteur NAD ∧ NADH, H^+.
Il n'y a pas de transporteur à l'oxaloacétate.
⎡ une réaction de *transamination* à partir du glutamate donne un NH_2 à l'oxaloacétate.
On obtient de l'a α cétoglutarique (l'oxaloacétate est un composé du cycle de Krebs ; il se trouve dans la mitochondrie). L'α cétoglutarate va pouvoir sortir par le même transporteur ① qui avait permis l'entrée du malate.
L'oxaloacétate en recevant une amine conduit à l' a. aspartique qui peut passer dans le cytosol par un transporteur ②. Une autre transaminase dans le cytosol va dedonner de l'oxaloacétate en transférant le NH_2 sur l'α cétoglutarate pour donner le glutamate qui peut repasser dans la mitochondrie.
⎜ le bilan est l'entrée des 2 H dans la mitochondrie ; ils vont prendre la chaîne respiratoire pour donner 3 ATP : il n'y a pas de perte d'énergie.

e) Bilan - états pathologiques

La mitochondrie est la centrale énergétique de la cellule. Son rôle est la synthèse de l'ATP.
La mitochondrie consomme de l'O_2 que lui apporte l'hémoglobine des GR sanguins : l'O_2 servira à faire H_2O et du CO_2 sera éliminé après la décarboxylation survenue au cours du cycle de Krebs.

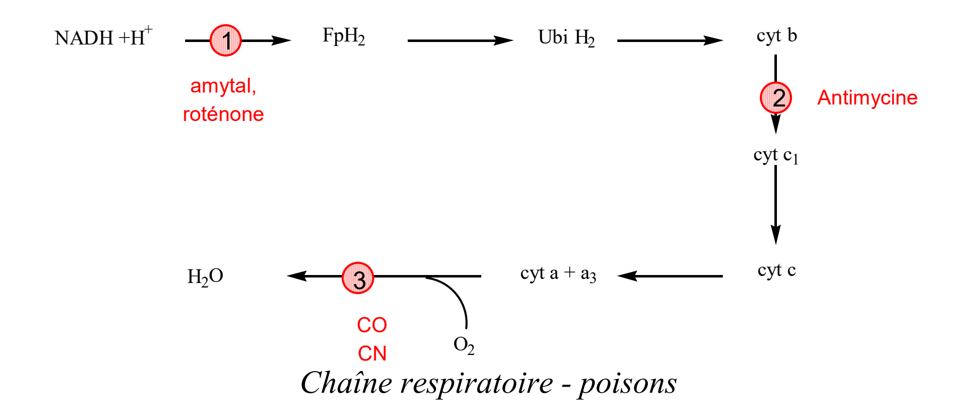
Glucose + 6 O_2 ∧ 6 CO_2 + 6 H_2O + ATP

- Une anomalie génétique touchant directement la chaîne respiratoire ne permettrait pas le développement de l'embryon.

- En absence d'apport d'O_2, les GR ne peuvent apporter l'O_2 aux tissus ∧ pas d'ATP dans la mitochondrie : = par absence d'oxygène : plus de gradient de concentration entre les membranes, le cerveau n'est plus nourri...

- L'absence d'O_2 peut être localisée à un tissu : cf. obstruction artérielle dans l'infarctus du myocarde (artères coronaires) ∧ mort cellulaire dans un territoire dépendant de l'artère obstruée ∧ passage dans le sang de transaminases SGOT.

- Poisons de la chaîne respiratoire :



Chaîne respiratoire - poisons

Différents toxiques ont été utilisés à l'origine pour localiser les différents éléments de la chaîne respiratoire et connaître sa chronologie. Quand la chaîne est bloquée, tout ce qui est en amont reste sous forme réduite et tout ce qui est en aval reste sous forme oxydée.

- La Roténone et l'Amytal bloquent la chaîne respiratoire au début ∧ blocage de NADH, H^+ mais pas de FAD.
- L'antimycine A bloque la chaîne entre cyt b et cyt c_1 ∧ arrêt de la respiration.
- Le cyanure agit lors de la dernière étape. Il a une double toxicité : les cytochrome ont une structure semblable à l'hème : CN se complexe aussi bien au fer de l'hème des GR et au fer des derniers cytochromes ⎡ la chaîne respiratoire est totalement bloquée, l'apport d'O_2 est arrêté ∧ mort très rapide. Le seul traitement est l'hyposulfite de sodium, produisant des thiocyanates moins toxiques.
- Le CO, oxyde de carbone – produit par des engins de chauffage qui ont une mauvaise combustion - a une grande affinité pour l'hémoglobine et les derniers cytochromes de la chaîne respiratoire. C'est un gaz incolore et inodore. Le traitement fait appel à l'oxygène : on applique la loi d'action de masse ⎡ on utilise d'énorme quantités d'oxygène sous forte pression (O_2 hyperbare)

- **Agents découplants**
  Dans certains cas, il n'y a pas de trouble de fonctionnement de la chaîne respiratoire : oxydation normale des O_2, mais il est impossible de fabriquer de l'ATP, toute l'énergie est dissipée sous forme de chaleur : *produits découplants*
  - *dinitrophénol* : rend perméable les membranes aux ions H^+.
  - dérivés de *l'arsenic* : l'arsenic se comporte vis à vis de ADP comme un équivalent du Phosphore. Il va entrer en compétition avec lui au niveau de l'ATP synthase ∧ ADP~arsenate. cette liaison n'est pas stable, elle est hydrolysée immédiatement avec production de chaleur. Elle ne peut pas synthétiser d'ATP. L'action est un peu différente de celle du DNP qui ∨ la perméabilité de la membrane : c'est une compétition au niveau du substrat de l'enzyme entre l'acide phosphorique et l'arsenic. C'est une intoxication à long terme.
  - il peut y avoir un *découplage physiologique* par les hormones thyroïdiennes. Il devient plus important que la normale en cas d'hyperthyroïdie ∧ métabolisme important pour faire les mêmes quantités d'ATP. (les sujets sont maigres et ont toujours trop chaud). C'est l'inverse dans l'hypothyroïdie (les sujets ont toujours froid).

  ⎡ rôle de la thyroïde dans la régulation de la thermogenèse des mammifères et des oiseaux.
  On a mis en évidence chez le rat, dans le tissu adipeux, une protéine : la *thermogénine* (synthétisée sous le contrôle de l'hormone thyroîdienne T_3) dont le rôle est d'augmenter la quantité de chaleur produite en fonction des besoins, de façon à

maintenir la température à une valeur correcte. Cette thermogénine permet la destruction du gradient de H^+ ; l'énergie produite dans la chaîne respiratoire est ainsi libérée sous forme de chaleur, sans production d'ATP.
On a trouvé récemment dans les différents tissus adipeux des gènes pour des protéines, appelées UCP (uncoupling protéins) : UCP1, 2 et 3. Lors de la production des hormones thyroïdiennes, on observe une ∨ de l'ARNm de ces 3 protéines UCP.